AMEA-nın Xəbərləri (biologiya və tibb elmləri), cild 68, №2, səh. 125-130 (2013)

Сравнительное Фармакологическое Исследование Действия Сбора «Антидиабет», Галеновых Препаратов Листьев Шелковицы Белой И Травы Донника Лекарственного На Течение Аллоксанмоделированного Сахарного Диабета

Р.Э. Джафарова, Г.Ш. Гараев

Научно-исследовательский центр Азербайджанского медицинского университета, Баку, Азербайджан; E-mail: jafarova@bk.ru

Основная цель исследований – на модели аллоксанового диабета оценить эффективность действия исследуемых галеновых препаратов на функциональные и биохимические показатели нарушения углеводного обмена. Эксперименты проводились на половозрелых белых беспородных крысах-самцах весом 189-313г. Модель аллоксанового диабета создавали внутрибрюшинным введением 200мг/кг аллоксанатригидрата. Животные были разделены на группы по 25 животных в каждой. Влияние исследуемых растительных средств на течение патологического аллоксанмоделированного процесса изучали в плацебоконтролируемых экспериментах. При этом в течение 3-х недель в группах отмечали летальность, изменения веса, потребления корма и воды, поведенческой активности. На 21 сутки животных забивали, кровь исследовали на содержание сахара, инсулина и С-пептида. В результате проведенных исследований было выявлено, что все исследуемые растительные препараты в отличие от синтетических сахароснижающих средств оказывают положительное влияние на течение аллоксанмоделированного СД. При этом относительно контрольной группы количество летальных случаев в группах животных, получавших исследуемые галеновые препараты, снижается, вес животных увеличивается. Реверсия диабетического статуса подтверждается снижением в плазме крови содержания сахара и повышением концентрации инсулина и С-пептида. Предлагаемый нами растительный сбор-фитокомплекс «Антидиабет» по всем исследуемым показателям превосходит применяемый в медицинской практике сбор «Мирфазин».

Ключевые слова: *сахарный диабет, модель, аллоксан, инсулин, С-пептид*

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день фитотерапия широко используется в комплексном лечении сахарного диабета (СД) (Singh et al., 2010) и рядом исследований доказано, что при этом замедляется развитие самой болезни и его поздних осложнений (Nyenwe et al., 2011). Некоторые авторы считают, что ряд биологически активных веществ растений, и в особенности флавоноиды оказывают при СД положительное патогенетическое действие (Недосугова, 2006). Однако для оптимального использования растительных препаратов в клинической практике нет достаточных экспериментальных обоснований их эффективности и механизма действия.

Исходя из вышесказанного, мы сочли целесообразным изучить на аллоксановой модели сахарного диабета действие галеновых препаратов листьев шелковицы белой,

травы донника лекарственного и сбора «Антидиабет», полученного на основании результатов исследования сахароснижающих растений флоры Азербайджана и сравнить полученные результаты с эффективностью действия лекарственного сбора «Мирфазин». Для возможности интерпретации результатов, эти данные сравнивали с показателями, которые были получены при применении в тех же условиях препаратов, механизм сахароснижающего эффекта которых хорошо изучен (инсулин, метформин, глибенкланид, танакан).

Наиболее хорошо изученной моделью СД является аллоксановая модель. Она характеризуется острой картиной протекания патологии. При этом большое значение для оценки развития патологии наряду с повышением концентрации сахара в крови, имеет тяжесть метаболических расстройств, которая иллюстрируется фактом гибели животных, изменением веса тела, потребления корма и воды, поведенческой активности. Поэтому, исследование этих показателей дает реальную картину изменения клиники процесса под действием исследуемых препаратов и отражает степень эффективности их действия (Экспериментальный сахарный диабет, 1983). При этом функциональное состояния ß-клеток островкового аппарата поджелудочной железы подопытных животных и эффективность действия препаратов может оцениваться по концентрации в крови инсулина и С-пептида (Экспериментальный сахарный диабет, 1983).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В работе использовались половозрелые беспородные крысы-самцы массой тела 189-313 г. Животные были разделены на группы по 25 крыс в каждой. После предварительной 24 часовой голодовки тест-методом определяли сахар в крови животных, затем, взвешивали и вводили внутрибрюшинно раствор аллоксанатригидрата в разовой дозе 200 мг/кг (Экспериментальный сахарный диабет, (1983). Учитывая, что в модели резкое повышение сахара начинается на вторые - третьи сутки после введения аллоксана, все препараты назначали через день с начала эксперимента. Растительные настои для экспериментов готовились “extempero” в соотношении 1:10 и вводились животным в соответствующих дозах внутрь посредством зонда.

1-я группа(контрольная), получала внутрь 1мл/100г физиологический раствор натрия хлорида.

Во 2-й группе животным вводили настой сбора «Антидиабет» в дозах 1мл/100г 3 раза в день.

Животные в 3-й группе 3 раза в день получали настой листьев шелковицы в дозе 1мл/100г.

Животным 4-й группы вводили внутрь 3раза в день по 1мл/100г настоя донника.

5-я группа получала по 1мл/100г настоя сбора «Мирфазин» 3 раза в день.

6-я группа – танакан в дозе 1мг/кг 3 раза в день.

7-я группа – глибенкламид в дозе 0,1мг/кг 1раз в день.

8-я группа – метформин (Сиофор 500) в дозе 5 мг/кг 2 раза в день.

Животным 9-й группы подкожно водили инсулин в дозе 1 ед/кг 2раза в день.

Во всех группах фиксировали функциональные изменения. На 21 сутки, после предварительной 24 часовой голодовки, животных взвешивали и, затем, декапитировав забирали кровь на анализ для определения содержания сахара, инсулина и С-пептида.

Содержание сахара в крови определяли при помощи индикаторной бумаги IME-DC тест-анализатором, инсулин и С-пептид в крови определяли методом ИФА – иммуноферментативным анализатором Chemwell с использованием стандартного набора реактивов DEMENITECKILL-WELLSEE, Cermany.

Статистическую обработку полученных результатов проводили параметрическим методом Фишера-Стьюдента и непараметрическими – методом Уилкоксона-Манна-Уитни (критерий U), Розенбаума (критерий Q), а летальность - точным методом Фишера (ТМФ) (Статистические методы исследования…, 1971).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При определении действия исследуемых препаратов на летальность животных было выявлено, что в 1-й группе умерло 17 крыс из 25, что составило 68% (P≤0,025). Во 2-й группе умерла 1 крыса из 25, что составило 4% (P≤0,025), в 3-й группе умерли 2 крысы из 25, что составило 8% (P≤0,025). Результаты, полученные во 2-й и 3-й группах статистически не достоверны для данной выборки, и смерть животных в этом случае носит случайный характер, не зависящий от применения препаратов. В 4-й группе умерли 9 крыс из 25, что составило 36% (P≤0,025), в 5-й – 12 крыс из 25 что составило 48% (P≤0,025). В 6-ой, 7-ой, 8-ой и 9-ой группах летальность составляла 40% (P<0,25), 60% (P<0,25), 80% (P<0,25), 20% (P<0,25) соответственно.

Как видно из результатов, летальность в группах, получавших растительные препараты значительно меньше, чем в контрольной группе и группах, получавших синтетические противодиабетические средства. Причем, сбор «Антидиабет» и настой листьев шелковицы белой оказывают наиболее благоприятное действие на выживание животных при аллоксановом диабете, превышающем действие препарата сбора «Мирфазин» соответственно на 32% и 28%. Синтетические противодиабетичес-кие средства метформин и глибенкламид по сравнению с растительными средствами не повышают выживаемость животных при введении им аллоксана в дозе 200 мг/кг, а глибенкламид даже несколько повышает ввиду известной дополнительной собственной токсичности (Bolen et al., 2007).

Вес животных, оставшихся в живых на 21 день (таблица 1) в 1-й группе составил 109,75±0,8 г при исходном 296,64±1,85 г, снизившись на 63,0%; во 2-й группе вес животных составил 308,54±4,45 г при исходном 240,24±1,58 г, увеличившись на 48,7%; в 3-й группе вес с 250,0±3,31 г в интакте увеличился на 9,22% и составил 263,86±3,21; в 4-й группе – с 217,4±2,5 в интакте снизился на 4,9% и составил 206,76±3,04 г; в 5 группе вес интактных животных, составляющий 282,48±3,92 г практически не изменился (был

Таблица 1. Изменения в весе животных при применении исследуемых препаратов на фоне внутрибрюшинного введения 200мг/кг аллоксанатригидрата.

№ группы	Статистические показатели	Вес животных в граммах	
		интактное состояние	на 21 сутки
1	M±m	296,64±1,85	109,75±0,8
	Min-Max	276-313	103-129
	P	-	U=0; P≤0,01
2	M±m	240,24±1,58	308,54±4,45
	Min-Max	229-255	269-349
	P	-	Q =49; P<0,01
3	M±m	250,0±3,31	263,86±3,21
	Min-Max	234-281	245-295
	P	-	U=109; P≤0,01
4	M±m	217,4±2,5	206,76±3,04
	Min-Max	203-253	189-240
	P	-	Q =49; P<0,01
5	M±m	282,48±3,92	280,8±4,15
	Min-Max	189-312	253-311
	P	-	Q =2; P>0,05
6	M±m	227,28±0,66	219,13±2,08
	Min-Max	218-231	205-232
	P	-	U=37; P<0,01

7	M±m	226,0±1,026	147,6±4,47
	Min-Max	217-233	136-156
	P	-	U=0; P<0,01
8	M±m	220,92±0,55	169,29±10,8
	Min-Max	217-227	124-220
	P	-	U=6; P<0,01
9	M±m	227,6±1,34	297,3±3,02
	Min-Max	218-241	265-315
	P	-	U=0; P<0,01

P –достоверность различий в вариационных рядах
U- непараметрический критерий Уилкоксона- Манна- Уитни
Q- непараметрический критерий Розенбаума

меньше среднего веса животных в интактном состоянии на 0,59% при Q=2; P≤0,05, что не подтверждается статистически и носит случайный характер). В 6-й группе исходный вес животных 227,28±0,66 г снизился на 3,6% и составил 219,13±2,08 г, в 7-й группе вес 226,0±1,026 г снизился на 34,7% и составил 147,6±4,47 г. В 8-й группе вес интактных крыс равный 220,92±0,55 г снизился на 23,4% и составил 169,2±10,8 г, а в 9-й группе он к концу эксперимента составлял 297,3±3,02 г при исходном 227,6±1,34 г, увеличившись на 30,6%.

Сравнивая полученные результаты, приходим к заключению, что по этому показателю препараты сбора «Антидиабет» и листьев шелковицы белой превосходят сбор «Мирфазин» и другие исследуемые препараты.

Отклонений по массе органов, взятых при некропсии, в группах не наблюдалось, однако отмечались значительные патоморфологические изменения при проведении биохимического и гистологического исследования.

Отслеживание общего состояния животных показало, что по сравнению с контрольной группой и группами животных, получавших синтетические сахароснижающие препараты в группах, которым вводился инсулин и растительные препараты, поведенческая активность животных повысилась, агрессивность уменьшилась, язвы на поверхности кожи зажили быстрее, потребность в воде резко уменьшилась.

Результаты анализа плазмы крови на определение содержания сахара представлены в таблице 2. Как видно из таблицы, концентрация сахара в крови интактных животных определяемый в пределах 111,8±1,46 mg/dl в 1-й группе повысился на 370,7% и достиг значений равных 526,2±3,76 mg/dl. Во 2-й группе по сравнению с к контрольной группой – снизился на 76,9%, в 3-й – на 75,5%, в 4-й – на 44,5%, в 5-й – на 75,4%, в 6- й на 29,3%. В 7- й группе содержание сахара в плазме крови стало меньше на 8,3%, в 8-й – на 58,8%, в 9-й – на 77,6%.

Как видно из полученных результатов снижение сахара в крови моделированных аллоксаном животных, получавших лечение растительными средствами, имеет статистически достоверные более низкие значения, чем у животных получавших лечение синтетическими средствами. Экзогенный инсулин, как и предполагалось, снижает сахар в крови животных, восполняя дефицит эндогенного инсулина.

Таблица 2. Изменения содержания сахара, инсулина, и С-пептида в плазме крови животных при применении исследуемых препаратов на фоне аллоксановой модели СД (n=5)

№ группы	Статистические показатели	Сахар (mg/ml)	Инсулин (мкED/ml)	С-пептид (ng/ml)
Интакт	M±m	111,8±1,46	3,8±0,12	0,15±0,01
	Min-Max	108-115	3,4-4,1	0,12-0,18
	P	-	-	-
1	M±m	526,2±3,76	0,16±0,09	0,006±0,0015
	Min-Max	518-539	0,0-0.5	0,00-0.01
	Pинтакт	P<0,01	P<0,01	P<0,01

2	M±m	121,8±3,5	1,16±0,11	0,046±0,0044
	Min-Max	113-131	0,9-1,5	0,03-0,05
	Рконтр.	P<0,01	P<0,01	P<0,01
3	M±m	129±2,68	1,120±0,038	0,044±0,005
	Min-Max	123-139	1,0-1,2	0,03-0,06
	Рконтр.	P<0,01	P<0,01	P<0,01
4	M±m	292,2±8,24	0,72±0,13	0,03±0,0045
	Min-Max	261-307	0,4-1,1	0,02-0,04
	Рконтр.	P<0,01	P<0,01	P<0,01
5	M±m	129,2±9,6	0,48 ±0,07	0,02±0,0032
	Min-Max	119- 136	0,3-0,7	0,01-0,03
	Рконтр.	P<0,01	P<0,05	P<0,01
6	M±m	371,8±13,83	0,2±0,032	0,008±0,002
	Min-Max	317-388	0,1-0,3	0,00-0,01
	Рконтр.	P<0,01	P<0,05	P<0,05
7	M±m	445,4±11,23	0,2±0,07	0,008±0,001
	Min-Max	421-483	0,0-0,4	0,00-0,01
	Рконтр.	P<0,01	P<0,05	P<0,05
8	M±m	216,6±3,12	0,24±0,05	0,01±0,005
	Min-Max	207-225	0,0-0,3	0,0-0,03
	Рконтр.	P<0,01	P<0,05	P<0,05
9	M±m	118±3,7	2,94±0,17	0,004±0,002
	Min-Max	107-127	2,5-3,5	0,0-0,02
	Рконтр.	P<0,01	P<0,01	P>0,05

Настой сбора «Антидиабет», превосходит по эффективности снижения сахара в крови сбор «Мирфазин», настой листьев шелковицы белой и настой донника лекарственного. Высокая эффективность применяемых растительных средств может быть связана с наличием различных биологически активных веществ, в том числе флавоноидов, которые обеспечивают полифакторность их действия. Танакан - экстракт растения Гинко Билоба, как и указывается в литературе, несмотря на содержание флавоноидов, оказывающих АО действие, сахароснижающий эффект в практически значимой степени не продемонстрировал. Метформин, по всей вероятности, учитывая известный механизм действия, связанный, прежде всего, с подавлением глюконеогенеза и увеличением синтеза гликогена в печени, уменьшает продукцию глюкозы печенью в среднем на 30%, что приводит к снижению уровня глюкозы крови натощак (Аметов, 2009; Bolen et al., 2007). Глибенкламид, с учетом естественной реверсии диабетического статуса у аллоксанмоделированных крыс практически не снижал плазменной концентрации сахара.

При определении содержания инсулина и С-пептида были получены следующие результаты, представленные в таблице №2: Концентрация инсулина в плазме крови интактных животных составляла 3,8±0,12мкED/ml, а С-пептида – 0,15±0,01ng/ml. В 1-й группе эти показатели снизились на 95,8% и 96,0% соответственно. Во 2-й группе по сравнению с контрольной группой эти показатели возросли на 626,0% и 666,6% соответственно; в-3-й – на 837,5% и 633,3%; в 4-й – на 350,0% и 400,0%; в 5-й– на 200,0% и 233,3%; 6-й– на 25,0% и 33,3%; 7-й– на 25,0% и 33,3%; 8-й– на 50,0 % и 66,7%: в 9-й – концентрация инсулина определялась в количестве 2,94±0,17мкED/ml, но содержание С-пептида при этом снизилось на 33,3%.

Как видно из полученных результатов, повышение концентрации инсулина и С-пептида в крови модулированных аллоксаном животных, получавших лечение растительными средствами, имеют статистически достоверные более высокие значения, чем у животных, получавших лечение синтетическими препаратами. Экзогенный инсулин, определяется в крови в пределах допустимых норм, но отсутствие С-пептида говорит о том, что эндогенный

инсулин не вырабатывается. Сбор «Антидиабет», настой шелковицы белой увеличивают содержание инсулина и с-пептида в крови в более значительных количествах, чем сбор «Мирфазин». Метформин и глибенкламид практически не меняют эти показатели.

Таким образом, в отличие от синтетических препаратов и инсулина, исследуемые растительные средства, за исключениием танакана, увеличивают в разной степени концентрацию инсулина и С-пептида в крови.

Анализ полученных результатов позволяет предположить, что в механизмесахароснижающего действия исследуемых галеновых препаратов лежит в первую очередь специфическое антиоксидантное свойство их флавоноидов. Флавоноиды, являясь ловушками для свободных радикалов, а также непосредственно вступая в окислительно-восстановительную реакцию с аллоксаном, нейтрализуют его токсическое действие; насыщают организм экзогенными антиоксидантами, тем самым повышают эффективность собственной системы антиоксидантной защиты организма и защищают клетки от повреждения. Поэтому, применение растительных препаратов, содержащие флавоноиды при СД, может рассматриваться патогенетическим методом лечения этой болезни.

Анализ полученных результатов позволяет предположить, что в механизмах сахароснижающего действия исследуемых галеновых препаратов лежат в первую очередь их антиокидантные свойства, связанный со специфическим составом биологически активных соединений, и в первую очередь флавоноидов. Флавоноиды, являясь ловушками для свободных радикалов, насыщают организм экзогенными антиоксидантами, тем самым повышая эффективность собственной системы антиоксидантной защиты, уберегают клетки от повреждения. Это свойство флавоноидов может быть очень значимым в клинической интерпретации полученных результатов. Как известно, при гипергликемии концентрация свободнорадикальных соединений резко увеличивается, что приводит к развитию болезни и его осложнений. Поэтому применение растительных препаратов, содержащих биологически активные флавоноиды, может рассматриваться патогенетическим методом лечения СД.

ЛИТЕРАТУРА

Аметов А.С. (2009) Нарушение в системе гемостаза при сахарном диабете и пути их коррекции при назначении комбинированной терапии диабетоном и метформином. Сахарный диабет, **№3:** 33-39.

Недосугова Л.В. (2006) Окислительный стресс при сахарном диабете 2-го типа и возможности его медикаментозной коррекции. Автореф. дис. … д.м.н. Москва: 30 с.

Статистические методы исследования в медицине и здравоохранении (1971). Под ред. проф. Л.Е.Полякова. Л.: Медицина, 199 с.

Экспериментальный сахарный диабет. (1983) Под ред. академика АМН СССР В.Г.Баранова. Л.: Наука, 240 с.

Bolen S., Feldman L., Vassy J. et al. (2007) Systematic review: comparative effectiveness and safety of oral medications for type 2 diabetes mellitus. Ann. Intern. Med., **147(6):** 386-399.

Nyenwe E.A., Jerkins T.W., Umpierrez G.E., Kitabchi A.E. (2011) Management of type 2 diabetes: evolving strategies for the treatment of patients with type 2 diabetes. Metabolism, **60:** 1-23

Singh I., Singh P.K., Bhansali S., Shafiq N., Malhotra S., Pandhi P., Pal Singh A. (2010) Effects of three different doses of a fruit extract of Termin aliachebulaon metabolic components of metabolic syndrome, in a rat model. Phytother. Res., **24:** 107-112

“Antidiabet” Yığıntısı, Ağ Tut Yarpaqları Və Dərman Xəşəmbülü Otunun Qalen Preparatlarının Allorsan İlə Modelləşdirilmiş Şəkərli Diabetin Gedişatına Təsirlərinin Müqayisəli Farmakoloji Tədqiqi

R.Ə.Cəfərova, Q.Ş.Qarayev

Azəbaycan Tibb Universitetinin Elmi-Tədqiqat Mərkəzi, Bakı, Azərbaycan

Tədqiqatın əsas məqsədi alloksan diabeti modeli üzərində tətbiq olunan qalen preparatlarının pozulmuş karbohidrat mübadiləsi zamanı funksional və biokimyəvi göstəricilərə təsir effektivliyini qiymətləndirməkdən ibarət olmuşdur. Tədqiqatlar çəkisi 189-313q olan cinsi yetişkən ağ erkək siçovullar üzərində aparılmışdır. Alloksan diabeti modeli siçovulların qarın boşluğuna 200 mg/kq alloksantrihidrat yeridilməklə yaradılmışdır. Heyvanlar hər birində 25 siçovul olmaqla qruplara ayrılmışdır. 3 həftə müddətində qruplarda ölüm, çəkinin dəyişməsi, qida və su istifadəsi, davranış aktivliyi qeyd olunmuşdur. 21-ci gün heyvanlar kəsilmiş, qanda şəkər, insulin və C-peptidin miqdarı təyin edilmişdir. Tədqiqatların nəticəsindən aydın olmuşdur ki, şəkərli diabetin alloksan modeli fonundatədbiq olunan bütün bitki mənşəli maddələr müsbət təsir göstərirlər:kontrol qrupla müqayisədə qalen preparatları tədbiq olunan qruplarında ölüm hallarının sayı azalır, heyvanların çəkisi artır, qan plazmasında şəkərin miqdarı azalır, insulin və C-peptidin miqdarının artması baş verir. Tərəfimizdən təklif olunan bitki yığıntısı – fitokompleks “Antidiabet” tədqiq olunan bütün göstəricilərə görə tibbdə istifadə olunan Mirfazin preparatından üstündür.

Açar sözlər: *şəkərli diabet, model, alloksan, insulin, C-peptid*

Comparative Pharmacological Study Of the Effect Of Collection of "Antidiabet" Galenical Medicines Of Mulberry Leaves and White And Grass Clover Medicinalis on the course of alloxan Modeling Diabetes Mellitus

R.A.Jafarova, G.Sh.Garayev

Research Center of Azerbaijan Medical University

The main purpose of the study was to evaluate the effect of galenical preparations on

the functional and biochemical indices of the disturbance of carbohydrate metabolism using the model of alloxan diabetes. The experiments were performed on adult albino male rats weighing 189-313g. The alloxan diabetes model was created by intraperitoneal injection of 200 mg/kg alloxantrihydrate. The animals were divided into groups of 25 animals each. During 3 weeks mortality, changes of weight, food and water consumption, behavioral activity were observed in the groups. On the 21st day the animals were slain and examined for blood sugar, insulin and C-peptide. The studies revealed that all tested plant preparations contrary to synthetic hypoglycemic agents had a positive influence on the course of the alloxan modeling diabetus mellitus. The number of death cases in the group of animals treated with the studied galenical medicines reduced compared with the control group, but weight of the animals increased. Reversal of diabetic status confirmed decrease in plasma sugar, higher insulin and C-peptide. Our proposed plant collection – phytocomplex "Antidiabet" in all investigated indices exceeds used in medical practice drug "Mirfazin".

Key words: *diabetes mellitus, model, alloxan, insulin, C-peptide*